

AC-2 08/288 336



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer: **0 173 177 B1**

# EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

12

Veröffentlichungstag der Patentschrift: 22.04.92

Int. Cl. 5. **C12N 15/85, C12N 7/00, //C12R1/91**

Anmeldenummer: 85110299.2

Anmeldetag: 16.08.85

VITRON I = 1262-1848

Enhancer für eukaryotische Expressionssysteme.

Priorität: 24.08.84 DE 3431140

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
05.03.86 Patentblatt 88/10

Bekanntmachung des Hinweises auf die  
Patenterteilung:  
22.04.92 Patentblatt 92/17

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Entgegenhaltungen:

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY  
OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA, Vol. 81, No. 3, Februar 1985  
(Baltimore, USA) D.R. THOMSEN et al.  
"Promoter-regulatory region of the major im-  
mediate early gene of human cytomegaloviri-  
us" Seiten 659-663

JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 49, No. 2, Fe-  
bruar 1984 (Washington D.C.) G. JAHN et al.  
"Predominant Immediate-Early Transcripts  
of Human Cytomegalovirus AD 169" Seiten  
363-370

Patentinhaber: BEHRINGWERKE Aktiengesell-  
schaft  
Postfach 1140  
W-3550 Marburg 1(DE)

Erfinder: Fleckenstein, Bernhard, Prof. Dr.  
Haus-Nr. 93  
W-8551 Schlaifhausen(DE)  
Erfinder: Schaffner, Walter, Prof. Dr.  
Bodenstrasse 8  
CH-8104 Weiningen(CH)  
Erfinder: Boshart, Michael, Dr.  
Zeppelinstrasse 41  
W-6900 Heidelberg(DE)  
Erfinder: Weber, Frank, Dr.  
Engerfeldstrasse 9  
CH-4310 Rheinfelden(CH)  
Erfinder: Jahn, Gerhard, Dr.  
Effeltricher Strasse 11  
W-8524 Neunkirchen(DE)  
Erfinder: Dorsch-Häsler, Karoline, Dr.  
Apfelbaumstrasse 43  
CH-8050 Zürich(CH)

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 0 173 177 B1

GENE, Vol. 18, No. 1, April 1982 (Amsterdam)  
P.J. GREENAWAY et al. "Human Cytomegalovirus DNA: Bam HI, Eco RI and Pst I restriction endonuclease cleavage maps" Seiten 355-360

CELL, Vol. 36, No. 4, April 1984 (Cambridge, Mass.) F. WEBER et al. "An SV40 "Enhancer Trap" Incorporates Exogenous Enhancers of Generates Enhancers from its Own Sequences" Seiten 983-992

Ⓜ Vertreter: Becker, Heinrich Karl Engelbert, Dr.  
et al  
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT Central  
Patent Department P.O. Box 80 03 20  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

EP 0.473 177 B1

## Beschreibung

Die Erfindung ist in den Ansprüchen 1 bis 3 definiert, bevorzugte Ausgestaltungen des Verfahrens nach Anspruch 3 sind in den Ansprüchen 4 und 5 wiedergegeben. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen folgen.

Die "Enhancer-Falle" ist beschrieben bei F. Weber et al., Cell 36 (1984) 883-892, zur HCMV-DNA siehe G. Jahn et al., J. Virology, Feb. 1984, Vol. 48, 363-370 und dort zitierte Literatur, ferner D. R. Thomsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984), 859-863, und P. J. Greenaway et al., Gene 18 (1982) 355-360.

Der Enhancer ist in der HCMV-DNA im Hind III E-Fragment lokalisiert (Greenaway et al., a.a.O.), das das Pst I m-Fragment umfaßt (etwa 2,1 kb).

Nach Anspruch 2 wurden 2 Rekombinanten isoliert, die 341 bzw. 262 bp HCMV-DNA enthielten, angeordnet bei Position -118 bis -458 bzw. -263 bis -524 der publizierten DNA-Sequenz (Greenaway et al., a.a.O.). Die Überlappung von 186 bp enthält einen wesentlichen Teil des Enhancers. Deletionsmutanten, z. B. erhalten durch Aha II und Religieren der Fragmente in unterschiedlichen Kombinationen, sind ebenfalls Enhancer-aktiv.

DNA, die zu mindestens 75, vorzugsweise mindestens 80 % Sequenz-homolog mit reisolierter HCMV-spezifischer Enhancer-DNA ist bzw. damit hybridisiert, ist ebenfalls Erfindungsgegenstand.

Der Enhancer erhöht die Expression von Kaninchen-Betaglobin in HeLa-Zellen nach Einbau unterhalb des entsprechenden Gens um mindestens zwei Größenordnungen, unabhängig von der Orientierung. Damit ist der Enhancer um den Faktor 3-5 besser als der von SV40, abhängig vom Wirtssystem.

Der HCMV-Enhancer besitzt die Aktivität in einem weiten Spektrum an Wirtszellen (Primaten-, Mäuse-, Ratten- und Froschzellen). Er stimuliert die Expression von Proteinen in eukaryotischen Systemen und erleichtert dadurch die Produktion von modifizierten Proteinen, z. B. Glycoproteinen.

Bei der Anwendung kann auch der HCMV-eigene Promotor eliminiert werden, beispielsweise durch Abbau von etwa 100 bp mit Bal 31 über die Sac I-Schnittstelle hinaus. Gegebenenfalls kann die Enhancer-Sequenz durch Anbau von Adaptoren oder Linkern modifiziert werden.

Bei Verwendung mit dem eigenen Promotor kann ein eukaryotischer Promotor ersetzt werden, z. B. durch Einbau inklusive der ersten "splice donor consensus sequence" des IE-Gens vor der "splice acceptor sequence" des zu exprimierenden Gens.

In dem folgenden Beispiel wird die Erfindung näher erläutert.

## Beispiel

Nach Weber et al., a.a.O., wurde eine "Enhancer-Falle" durch Entfernen der 72 bp "repeat region" (Schneiden mit XbaI und KpnI) aus dem SV40-Genom hergestellt. Das PstI-m-Fragment (2,1 kb) von HCMV, Stamm AD 169, wurde durch Sonifikation in etwa 300 bp-große Stücke zerlegt und mit der "Enhancer-Falle" cotransfiziert. Aus den Kolonien, die das beste lytische Wachstum zeigten, wurde die rekombinante DNA isoliert. Es wurde durch Sequenzierung ein 262 bp-Segment von HCMV-DNA ermittelt, wobei auf einer Seite eine Ende-an-Ende-Ligierung eingetreten war, während auf der anderen Seite die Rekombination über eine 6 bp-Homologie zwischen HCMV (Nucleotide -531 bis -526, Figur 1a) und SV40 (Nucleotide 87 bis 72) erfolgte. Hierdurch ergab sich eine Deletion von 27 bp der SV40-DNA (Nucleotide 73 bis 99), die beide 21 bp-"repeats" des SV40 "early promoter" betraf. In der Restriktionskarte (Figur 1a) und in der DNA-Sequenz (Figur 1b) ist das 262 bp-Segment durch die eckigen Klammern und die Angabe "C4" bezeichnet. Eine weitere Enhancer-aktive Rekombinante mit 341 bp HCMV-DNA erwies sich als Ligationsprodukt mit den Enden eines linearen "Enhancer-Falle"-Moleküls (wobei einige Basen von den KpnI- und XbaI-Enden der SV40-DNA abgespalten waren, vermutlich durch exonucleolytischen Abbau vor der Ligation innerhalb der transfizierten Zelle). Die HCMV-DNA dieser Rekombinante ist in den Figuren 1a und 1b mit "C2" bezeichnet; sie erstreckt sich von -188 bis -458. Die Segmente C2 und C4 überlappen sich somit über einen Bereich von 196 bp.

Das Hind III C-Fragment des rekombinanten Virus mit der Insertion C4 und das PstI-m-Fragment von HCMV wurden zunächst in pUC8 (J. Vieira et al., Gene 19 (1982) 259-268) in beiden Orientierungen kloniert, als Hind III-Sall-Fragmente ausgeschnitten und zwischen die HindIII- und XhoI-Schnittstelle von p $\beta$ X14 rekloniert, also unterhalb des Kaninchen- $\beta$ -Globin-Gens (J. Banerji et al., Cell 27 (1981) 299-308; J. de Villiers et al., Nucl. Acids Res. 9 (1981) 6251-6254; S. Rusconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 5051-5055; H. Weber et al., ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 33 (1981) 367; B. Wasylyk et al., Cell 32 (1983) 503-514). Die Enhancer-Wirkung auf die  $\beta$ -Globin-Transkription wurde durch S1 Nuclease-Analyse cytoplasmatischer RNA nach "transient expression" in HeLa-Zellen bestimmt. Alle Konstruktionen wurden zusammen mit analogen Konstruktionen mit dem SV40-Enhancer unter standardisierten Bedingungen verglichen. Es zeigte sich, daß der HCMV-Enhancer die Synthese von  $\beta$ -Globin mindestens um 2 Größenordnungen - unabhängig von

der Orientierung - steigt.

#### Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:  
: BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. DNA-Fragment mit Enhancer-Aktivität für eukaryotische Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß sich das DNA-Fragment von der PstI-Schnittstelle, welche stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des PstI-m-Fragments des Human-Cytomegalievirus (HCMV) liegt, bis zur Position - 118 des genannten Fragments erstreckt, oder Enhancer-aktive Teile oder Mutanten davon. 10
2. DNA-Fragment nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich das DNA-Fragment von den Positionen - 524 bis - 118, - 524 bis - 263, - 524 bis - 458, - 458 bis - 118, - 458 bis - 263 oder - 263 bis - 118, vorzugsweise von - 118 bis - 458 oder - 263 bis - 524, erstreckt. 20
3. Verfahren zur Verbesserung eukaryotischer Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß oberhalb oder unterhalb des Strukturgens bzw. der Regulationsregion ein DNA-Fragment nach Anspruch 1 oder 2 eingebaut wird. 25
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment höchstens etwa 7000 bp oberhalb oder unterhalb der genannten Stellen eingebaut wird. 30
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment weniger als 3000 bp oberhalb oder unterhalb der genannten Stellen eingebaut wird. 35
6. Verwendung eines DNA-Fragments nach Anspruch 1 oder 2 zur Verbesserung eukaryotischer Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment oberhalb oder unterhalb des Strukturgens bzw. der Regulationsregion eingebaut wird. 40

#### Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: AT

1. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Fragments mit Enhancer-Aktivität für eukaryotische Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß ein DNA-Fragment, das sich von der PstI-Schnittstelle, welche stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des PstI-m-Fragments des Human-Cytomegalievirus (HCMV) liegt, bis zur Position - 118 des genannten Fragments erstreckt, oder Enhancer-aktive Teile oder Mutanten davon isoliert wird. 45

anten davon isoliert wird.

2. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Fragments nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich das DNA-Fragment von den Positionen - 524 bis - 118, - 524 bis - 263, - 524 bis - 458, - 458 bis - 118, - 458 bis - 263 oder - 263 bis - 118, vorzugsweise von - 118 bis - 458 oder - 263 bis - 524, erstreckt. 5
3. Verfahren zur Verbesserung eukaryotischer Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß oberhalb oder unterhalb des Strukturgens bzw. der Regulationsregion ein DNA-Fragment, das sich von der PstI-Schnittstelle, welche stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des PstI-m-Fragments des Human-Cytomegalievirus (HCMV) liegt, bis zur Position - 118 des genannten Fragments erstreckt, oder Enhancer-aktive Teile oder Mutanten davon eingebaut wird. 10
4. Verfahren zur Verbesserung eukaryotischer Expressionssysteme nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß oberhalb oder unterhalb des Strukturgens bzw. der Regulationsregion ein DNA-Fragment, das sich von den Positionen - 524 bis - 118, - 524 bis - 263, - 524 bis - 458, - 458 bis - 118, - 458 bis - 263 oder - 263 bis - 118, vorzugsweise von - 118 bis - 458 oder - 263 bis - 524 erstreckt, eingebaut wird. 15
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment höchstens etwa 7000 bp oberhalb oder unterhalb der genannten Stellen eingebaut wird. 20
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment weniger als 3000 bp oberhalb oder unterhalb der genannten Stellen eingebaut wird. 25
7. Verwendung eines DNA-Fragments, das sich von der PstI-Schnittstelle, welche stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt des PstI-m-Fragments des Human-Cytomegalievirus (HCMV) liegt, bis zur Position - 118 des genannten Fragments erstreckt, oder Enhancer-aktive Teile oder Mutanten davon, zur Verbesserung eukaryotischer Expressionssysteme, dadurch gekennzeichnet, daß das DNA-Fragment oberhalb oder unterhalb des Strukturgens bzw. der Regulationsregion eingebaut wird. 30
8. Verwendung eines DNA-Fragments nach Anspruch 7, das sich von den Positionen - 524 bis - 118, - 524 bis - 263, - 524 bis - 458, - 458 bis - 118, - 458 bis - 263 oder - 263 bis - 118, vorzugsweise von - 118 bis - 458 oder - 263 bis - 524, erstreckt. 35

EP 0 173 177 B1

5

6

458 bis - 118, - 458 bis - 263 oder - 263 bis - 118, vorzugsweise von - 118 bis - 458 oder - 263 bis - 524 erstreckt.

**Claims**

Claims for the following Contracting States :  
BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A DNA fragment with enhancer activity for eukaryotic expression systems, wherein the DNA fragment extends from the PstI cleavage site which is located upstream from the transcription start point of the PstI-m fragment of human cytomegalovirus (HCMV) to position -118 of said fragment, or enhancer-active parts or mutants thereof. 10
2. A DNA fragment as claimed in claim 1, wherein the DNA fragment extends from positions -524 to -118, -524 to -263, -524 to -458, -458 to -118, -458 to -263 or -263 to -118, preferably from -118 to -458 or -263 to -524. 20
3. A process for the improvement of eukaryotic expression systems, which comprises incorporation of a DNA fragment as claimed in claim 1 or 2, upstream or downstream of the structural gene or of the regulation region. 25
4. The process as claimed in claim 3, wherein the DNA fragment is incorporated not more than about 7,000 bp upstream or downstream of the sites specified. 30
5. The process as claimed in claim 3 or 4, wherein the DNA fragment is incorporated less than 3,000 bp upstream or downstream of the sites specified. 35
6. The use of a DNA fragment as claimed in claim 1 or 2 for the improvement of eukaryotic expression systems, wherein the DNA fragment is incorporated upstream or downstream of the structural gene or of the regulation region. 40

Claims for the following Contracting State : AT

1. A process for the preparation of a DNA fragment with enhancer activity for eukaryotic expression systems, which comprises isolation of a DNA fragment which extends from the PstI cleavage site which is located upstream from the transcription start point of the PstI-m fragment of human cytomegalovirus (HCMV) to position -118 of said fragment, or enhancer-active parts or mutants thereof. 50

2. The process for the preparation of a DNA fragment as claimed in claim 1, wherein the DNA fragment extends from positions -524 to -118, -524 to -263, -524 to -458, -458 to -118, -458 to -263 or -263 to -118, preferably from -118 to -458 or -263 to -524. 5

3. A process for the improvement of eukaryotic expression systems, which comprises incorporation of a DNA fragment which extends from the PstI cleavage site which is located upstream from the transcription start point of the PstI-m fragment of human cytomegalovirus (HCMV) to position -118 of said fragment, or enhancer-active parts or mutants thereof, upstream or downstream of the structural gene or of the regulation region. 10

4. The process for the improvement of eukaryotic expression systems as claimed in claim 3, wherein a DNA fragment which extends from positions -524 to -118, -524 to -263, -524 to -458, -458 to -118, -458 to -263 or -263 to -118, preferably from -118 to -458 or -263 to -524 is incorporated upstream or downstream of the structural gene or of the regulation region. 20

5. The process as claimed in claim 3 or 4, wherein the DNA fragment is incorporated not more than about 7,000 bp upstream or downstream of the sites specified. 25

6. The process as claimed in at least one of claims 3 to 5, wherein the DNA fragment is incorporated less than 3,000 bp upstream or downstream of the sites specified. 30

7. The use of a DNA fragment which extends from the PstI cleavage site which is located upstream from the transcription start point of the PstI-m fragment of human cytomegalovirus (HCMV) to position -118 of said fragment, or enhancer-active parts or mutants thereof for the improvement of eukaryotic expression systems, wherein the DNA fragment is incorporated upstream or downstream of the structural gene or of the regulation region. 35

8. The use of a DNA fragment as claimed in claim 7, which extends from positions -524 to -118, -524 to -263, -524 to -458, -458 to -118, -458 to -263 or -263 to -118, preferably from -118 to -458 or -263 to -524. 40

**Revendications**

Revendications pour les Etats contractants suivants : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

EP 0 173 177 B1

8

1. Fragment d'ADN possédant une activité d'activateur pour des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisé en ce que le fragment d'ADN s'étend du site de coupure de PstI, qui se trouve en amont du point de départ de la transcription du fragment PstI-m du cytomégalo-virus humain (HCMV), jusqu'à la position - 118 du fragment indiqué, ou parties ou mutants de celui-ci ayant une activité d'activateur.

2. Fragment d'ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fragment d'ADN va des positions - 524 à - 118, - 524 à - 263, - 524 à - 458, - 458 à - 118, - 458 à - 263 ou - 263 à - 118, de préférence de - 118 à - 458 ou de - 263 à - 524.

3. Procédé pour améliorer des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisé en ce qu'on insère un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2, en amont ou en aval du gène de structure ou de la région régulatrice.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on insère le fragment d'ADN, au plus, à environ 7000 bp en amont ou en aval de la position mentionnée.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'on insère le fragment d'ADN à moins de 3000 bp en amont ou en aval de la position mentionnée.

6. Utilisation d'un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2, pour améliorer des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisée en ce qu'on insère le fragment d'ADN en amont ou en aval du gène de structure ou de la région régulatrice.

#### Revendications pour l'Etat contractant suivant : AT

1. Procédé pour préparer un fragment d'ADN possédant une activité d'activateur pour des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisé en ce qu'on isole un fragment d'ADN qui s'étend du site de coupure de PstI, qui se trouve en amont du point de départ de la transcription du fragment PstI-m du cytomégalo-virus humain (HCMV), jusqu'à la position - 118 du fragment cité, ou des parties ou mutants de celui-ci ayant une activité d'activateur.

2. Procédé pour préparer un fragment d'ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fragment d'ADN va des positions - 524 à - 118, - 524 à - 263, - 524 à - 458, - 458 à -

118, - 458 à - 263 ou - 263 à - 118, de préférence de - 118 à - 458 ou de - 263 à - 524.

3. Procédé pour améliorer des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisé en ce qu'on insère, en amont ou en aval du gène de structure ou de la région régulatrice, un fragment d'ADN qui s'étend du site de coupure de PstI, qui se trouve en amont du point de départ de la transcription du fragment PstI-m du cytomégalo-virus humain (HCMV), jusqu'à la position - 118 du fragment cité, ou des parties ou mutants de celui-ci ayant une activité d'activateur.

4. Procédé pour améliorer des systèmes d'expression eucaryotes selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on insère, en amont ou en aval du gène de structure ou de la région régulatrice, un fragment d'ADN qui va des positions - 524 à - 118, - 524 à - 263, - 524 à - 458, - 458 à - 118, - 458 à - 263 ou - 263 à - 118, de préférence de - 118 à - 458 ou de - 263 à - 524.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'on insère le fragment d'ADN, au plus, à environ 7000 bp en amont ou en aval de la position mentionnée.

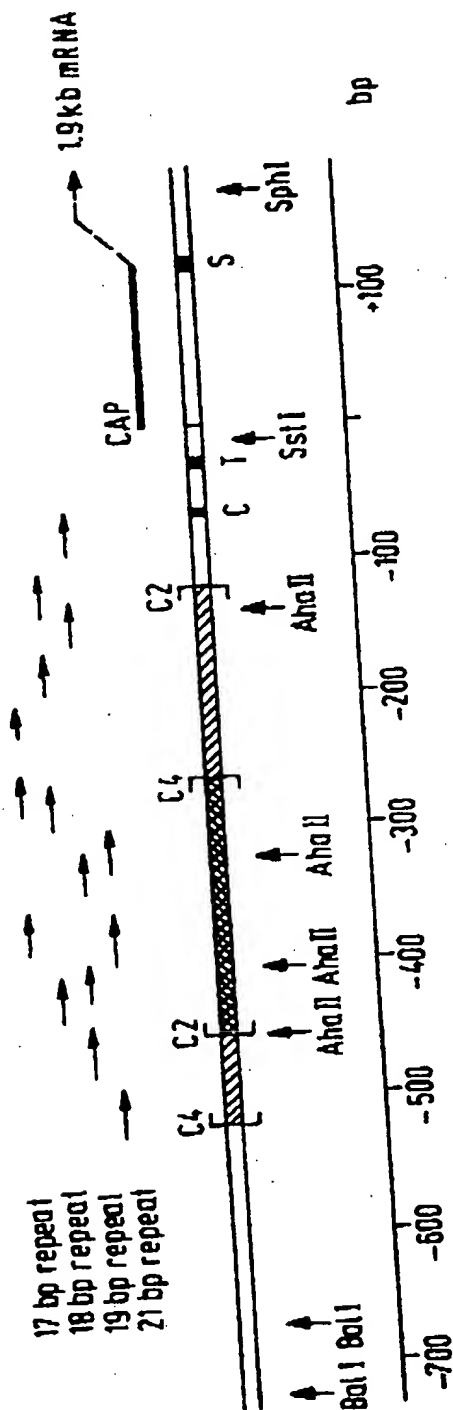
6. Procédé selon au moins une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'on insère le fragment d'ADN à moins de 3000 bp en amont ou en aval de la position mentionnée.

7. Utilisation d'un fragment d'ADN qui s'étend du site de coupure de PstI, qui se trouve en amont du point de départ de la transcription du fragment PstI-m du cytomégalo-virus humain (HCMV), jusqu'à la position - 118 du fragment cité, ou de parties ou mutants de celui-ci ayant une activité d'activateur, pour améliorer des systèmes d'expression eucaryotes, caractérisée en ce qu'on insère le fragment d'ADN en amont ou en aval du gène de structure ou de la région régulatrice.

8. Utilisation, selon la revendication 7, d'un fragment d'ADN qui va des positions - 524 à - 118, - 524 à - 263, - 524 à - 458, - 458 à - 118, - 458 à - 263 ou - 263 à - 118, de préférence de - 118 à - 458 ou de - 263 à - 524.

EP 0 173 177 B1

FIG. 1a



EP 0 173 177 B1

FIG.1b

405

-737 AATCAATAT GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATGGC TATGGCCAT TGCAIACGTT GTATCCATAT CATATATGT  
BglI

-637 ACATTATAT TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCAIAGCCC  
C2

-537 ATATATGGAG TTCGGGTGA CATAACTTAC GGTAAATGGC CGGCTGTCT GACCGCCCAA CGACCCCGG CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTCCG  
C4

-437 ATAGTAACGC CATAGGAC TTTCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATT ACGGTAACTI GCGGACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA  
C4

-337 GGGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGGCCGCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CTTTATGGGA CTTTCTTACT TGGCAGTACA TCTAGTATT  
C4

-237 AGTCAICGCT ATTACCATGG TGAATGGGTI TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGGG GTTTGACTCA CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTGAC  
C2

-137 GTCAATGGGA GTITGTITTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCCAT TGACGTAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT  
C2

-37 GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTGTGTTAG TGAACGCTCA GATGGCTTGG AGACGCCATC CACGCTGTIT TGACCCTCCAT AGAAGACACC GGGACCCGATC  
SstI

.64 CAGCTTCCGC GGGCGGGAAC GGTGCAITGG AACGGGAT CCGGTGCCA AGAGTGACGT AAGTACCGCC TATAGAGTCT ATAGGCCAC CCGCTTGGCT

.164 TCTTATGCAI GCATATCTGT TTTTGGCTTG  
SphI

1324



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**